

Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa

Clínica Universitária de Pediatria

Ano Letivo 2015/2016



FACULDADE DE
MEDICINA
LISBOA

U LISBOA

UNIVERSIDADE
DE LISBOA

Trabalho Final de Mestrado Integrado em Medicina

Utilidade da Calprotectina Fecal na Doença Inflamatória Intestinal em idade pediátrica

- Artigo de revisão bibliográfica -

Autor: Gonçalo João Viveiros Saldanha

Orientadora: Dr.^a Graça Oliveira

Elaborado segundo o novo acordo ortográfico

Agradecimentos

À minha mãe.

Ao meu pai.

Aos meus amigos.

À Dr.^a Graça Oliveira.

Índice

Resumo	5
1 - Introdução	6
1.1 - Doença Inflamatória Intestinal	6
1.2 - Calprotectina Fecal	6
2 - Particularidades da DII em idade pediátrica	7
3 - Calprotectina fecal no diagnóstico	7
3.1 - Distinção entre DII e SCI	7
3.2 - Valores de referência	10
4 - Monitorização da atividade da doença	11
5 - Monitorização da resposta ao tratamento	13
6 - Risco de recidiva	14
7 – Limitações da CF	14
8 - Discussão	15
9 – Conclusão	17
Bibliografia	18

Siglas

CF – Calprotectina Fecal

CU – Colite Ulcerosa

DC – Doença de Crohn

DII – Doença Inflamatória Intestinal

PCDAI – Pediatric Crohn's Disease Activity Index

PCR – Proteína C-reativa

PUCAI – Pediatric Ulcerative Colitis Activity Index

ROC – Receiver Operating Characteristic

SCI - Síndrome do Cólon Irritável

VS – Velocidade de Sedimentação

Resumo

A endoscopia com biópsia é atualmente o *gold standard* no diagnóstico e monitorização da Doença Inflamatória Intestinal (DII). Nos últimos anos tem sido proposto como complemento o doseamento da Calprotectina Fecal (CF), um marcador inflamatório intestinal, e estudado o seu valor diagnóstico, capacidade de monitorizar a atividade inflamatória da doença, orientar as decisões terapêuticas e prever a ocorrência de recidiva.

A realização de endoscopia na suspeita clínica de DII, sem existência de outros marcadores bioquímicos, leva a inúmeros resultados negativos, sujeitando desnecessariamente os doentes a este método invasivo não inócuo. O doseamento da CF apresenta elevada sensibilidade e moderada especificidade no estabelecimento do diagnóstico da DII, permitindo reduzir o número de endoscopias realizadas. Relativamente à monitorização da atividade da doença, a CF demonstrou boa correlação com a endoscopia e biópsia, permitindo detetar inflamação subclínica.

Há evidência de que a diminuição da CF após introdução da terapêutica está associada a boa resposta ao tratamento a longo prazo. Relativamente à predição da ocorrência de recidiva, estudos indicam que valores elevados de CF, em doentes em remissão clínica, estão associados a risco aumentado nos meses seguintes. Contudo, os estudos nestas áreas são ainda escassos.

O doseamento da CF pode então ser extremamente útil no estabelecimento do diagnóstico, monitorização da atividade da doença e, presumivelmente, na monitorização da resposta ao tratamento e determinação do risco de recidiva.

Abstract

Endoscopy with histological sampling is the gold standard in diagnosis and monitoring of Inflammatory Bowel Disease (IBD). Alternatively, the measurement of Fecal Calprotectin (FC) was proposed as a marker of intestinal inflammation, being tested his diagnostic value, capacity of monitoring the activity disease, therapeutic decisions and predict relapse.

However, selecting patients for endoscopy solely based on symptoms leads to innumerous negative results, exposing the patients to invasive procedures. The measurement of FC presents high sensibility and a modest specificity in establishing the diagnosis of IBD, reducing the amount of endoscopies. As to the monitoring of the disease activity, CF has showed a strong relation with endoscopy and histological sampling, strengthening its capacity to detect subclinical inflammation.

There's some evidence that decrease of FC after introduction of treatment is associated with a positive, long term, response. Other studies point out that high values of FC in clinical remission patients are associated with an augmented risk of relapse in the following months. However, studies in these areas are scarce.

The measurement of FC can be extremely useful in establishing the diagnosis, monitoring disease activity and, presumably, monitoring treatment response and determining the risk of relapse.

1 - Introdução

1.1 - Doença Inflamatória Intestinal

A Doença Inflamatória Intestinal (DII) representa um grupo de doenças caracterizadas por inflamação crônica do intestino, sendo as duas principais formas a Doença de Crohn (DC) e a Colite Ulcerosa (CU). A incidência da DII tem aumentando exponencialmente nos últimos anos, com mais prevalência nos países desenvolvidos. A CU afeta aproximadamente 100-200 em cada 100,000 indivíduos e a DC 50-100 em cada 100,000, sobretudo jovens e adultos entre os 15-35 anos^{1,2}. Em cerca de 20% dos casos as manifestações iniciais da doença surgem durante a idade pediátrica, sendo a DC mais prevalente neste grupo etário^{3,4}.

A etiologia da DII é ainda desconhecida, presumindo-se que seja causada pela desregulação da flora e imunidade gastrointestinal, associadas a fatores genéticos e ambientais^{5,6}.

A apresentação clínica da DII é muito variável pois depende da localização e extensão do processo inflamatório, devendo suspeitar-se desta patologia na presença de dor abdominal crônica (duração ≥ 4 semanas) ou recorrente (> 2 episódios em 6 meses), e/ou diarreia. A probabilidade de se tratar de DII é maior quando estão presentes fezes sanguinolentas, febre, anorexia, perda de peso e anemia⁷. A DC pode ainda complicar-se com a formação de abscessos perianais, fistulas e fibroestenose⁸. Relativamente às manifestações extraintestinais (ao nível dos ossos e articulações, pele, olhos, sistema hépato-biliar, pulmões e rins), estas ocorrem em aproximadamente 43% dos doentes com DC e 31% dos doentes com CU, não estando habitualmente presentes nos sintomas de apresentação da doença⁹.

O diagnóstico é efetuado através da combinação da clínica com parâmetros bioquímicos, avaliação endoscópica, histológica e imagiológica¹⁰.

O tratamento é baseado nas mais recentes *guidelines*, através da extrapolação de estudos realizados em adultos^{11,12}.

1.2 - Calprotectina Fecal

A calprotectina é uma proteína quelante do cálcio, constituindo 60% das proteínas citoplasmáticas presentes nos neutrófilos. Encontra-se também em concentrações inferiores nos monócitos e macrófagos, caracterizando-se por apresentar propriedades bactericidas e fungicidas¹³. Durante um processo inflamatório com recrutamento de neutrófilos é possível identificar concentrações elevadas de calprotectina no plasma, líquido sinovial, urina e fezes¹⁴. Esta última, denominada Calprotectina Fecal (CF), deriva da migração dos neutrófilos para o trato gastrointestinal aquando da disrupção da mucosa intestinal, durante o processo inflamatório, sendo depois excretada juntamente com as fezes¹⁵. A CF diferencia-se dos restantes marcadores

bioquímicos por apresentar grande resistência ao calor e por ser bastante estável em amostras de fezes durante períodos superiores a 7 dias, à temperatura ambiente¹⁶. A CF constitui, portanto, um marcador bioquímico de inflamação intestinal promissor na avaliação de patologias do trato gastrointestinal, nomeadamente da DII.

Este trabalho, através de uma revisão bibliográfica, pretende determinar a utilidade da CF em idade pediátrica, nomeadamente o seu valor para o diagnóstico, capacidade de monitorizar a atividade inflamatória da doença, orientar as decisões terapêuticas e prever a ocorrência de recidiva.

2 - Particularidades da DII em idade pediátrica

Apesar da apresentação clínica, diagnóstico e tratamento da DII serem muito semelhantes entre adultos e crianças, é importante reconhecer que existem especificidades neste grupo etário. A DII é frequentemente diagnosticada na pré-adolescência/adolescência, um período crucial no desenvolvimento físico, mental, emocional e social. Em particular, na DC, são frequentes alterações no ritmo de crescimento e na puberdade, associadas a desmineralização óssea, como consequência da malnutrição e inflamação persistentes^{17,18}.

Nesta faixa etária, os sintomas podem ser discretos mesmo na presença de inflamação exuberante, sendo o diagnóstico tanto mais difícil de efetuar quanto menor a idade da criança. Como consequência, o tempo decorrido entre o aparecimento dos primeiros sintomas e o diagnóstico é habitualmente longo, tendo a duração média de 5 meses¹⁷. É fundamental que a DII seja diagnosticada o mais precocemente possível, de modo a potenciar o desenvolvimento e melhoria da qualidade de vida da criança. É também importante reduzir o risco de complicações a longo prazo, nomeadamente fibroestenose, fístulas, displasia epitelial e cancro do trato gastrointestinal.

A avaliação e estratificação do risco dos doentes é então indispensável, idealmente através de um teste simples, barato, não-invasivo e com boa sensibilidade e especificidade, de modo a evitar investigações invasivas desnecessárias. Neste sentido, e há mais de uma década, foi proposto o doseamento da CF, tendo esta vindo a ser estudada quanto à sua aplicabilidade na prática clínica.

3 - Calprotectina fecal no diagnóstico

3.1 – Distinção entre DII e SCI

A DII e o Síndrome do Cólon Irritável (SCI), patologia funcional do trato gastrointestinal para a qual o tratamento é exclusivamente sintomático, apresentam um quadro sintomatológico muito semelhante, não sendo na maioria dos casos possível fazer o diagnóstico diferencial exclusivamente através dos sintomas. A endoscopia com biópsia é atualmente o *gold standard* na investigação destes

doentes, sendo realizada em indivíduos com sintomatologia sugestiva, não só para estabelecer o diagnóstico mas também, e caso se trate de DII, determinar a extensão, localização e gravidade da doença, diferenciando DC de CU¹⁹. No entanto, este procedimento é extremamente invasivo, desconfortável, oneroso e não completamente inócuo, requerendo normalmente internamento hospitalar, jejum, preparação intestinal e anestesia, sobretudo em crianças. Selecionar doentes para endoscopia considerando exclusivamente o quadro sintomatológico é também bastante falível, o que conduz a aproximadamente 39% de resultados negativos que poderão corresponder a SCI²⁰. É por isso fundamental que estes indivíduos sejam rapidamente identificados, de modo a evitar que sejam sujeitos a procedimentos invasivos desnecessários. Neste sentido, o doseamento da CF surge como um marcador bioquímico útil para o diagnóstico diferencial de DII e SCI, sendo necessário somente fornecer um recipiente e as instruções para uma adequada colheita das fezes²¹.

Em 1992, Roseth *et al* documentou pela primeira vez a elevação da CF em doentes com CU e DC¹⁶. No entanto, só mais recentemente foram efetuados estudos específicos à idade pediátrica. Numa meta-análise elaborada por Von Roon *et al*, os níveis de CF foram superiores em doentes com DII, comparativamente a doentes sem DII (saudáveis ou com SCI), com uma precisão diagnóstica na distinção entre estes dois grupos de 83% (sensibilidade) e 85% (especificidade), para um *cut-off* de 50 µg/g. Utilizando um *cut-off* de 100 µg/g, estes valores subiram para 98% (sensibilidade) e 97% (especificidade)²². Van Rheenen *et al* elaborou posteriormente outra meta-análise, com recolha de fezes prévia à avaliação endoscópica, obtendo uma sensibilidade de 92% e especificidade de 76% no diagnóstico de DII²³. Estes resultados estão em consonância com as meta-análises elaboradas mais recentemente por Henderson *et al* (sensibilidade: 98% e especificidade: 68%) e Degraeuwe *et al* (sensibilidade: 97% e especificidade: 70%)^{24,25}. Esta moderada especificidade poderá ser justificada pela multiplicidade de causas que levam ao aumento da CF (*tabela 1*), assim como pela inclusão de latentes e crianças com idade <5 anos nestes estudos. Nesta idade as fezes são colhidas diretamente da fralda e uma vez que a água é absorvida pela mesma, os valores de CF são sobrestimados²³. A discrepância de especificidade entre estes estudos e o de Von Roon *et al* poderá ainda dever-se à inclusão de grupos controlo saudáveis neste último, sobrestimando-a. Van Rheenen *et al* concluiu ainda que utilizando a CF como primeira ferramenta diagnóstica, como sugerido pelo algoritmo da *figura 1*, o número de endoscopias realizadas seria reduzido em 35%, considerando como única exceção a presença de hemorragia retal persistente, a qual justifica endoscopia urgente²³.

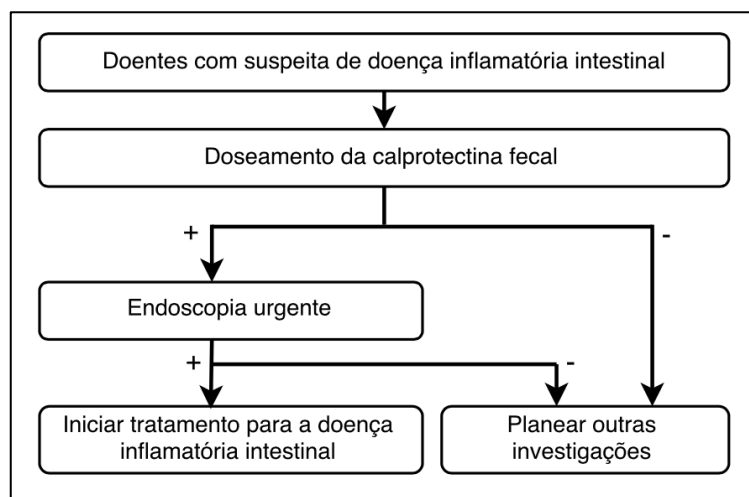


Figura 1 | Calprotectina fecal no diagnóstico da DII (adaptado de van Rheenen, P. F., Van de Vijver, E. & Fidler, V. *Faecal calprotectin for screening of patients with suspected inflammatory bowel disease: diagnostic meta-analysis.*)

No entanto, e utilizando esta abordagem, verificar-se-iam 9% de falsos positivos e 5% de falsos negativos, contribuindo para um atraso no estabelecimento do diagnóstico em 8% das crianças e adolescentes²³. Em todo o caso, no grupo dos falsos positivos estariam incluídas outras patologias gastrointestinais que levam igualmente à elevação da CF e que requereriam inevitavelmente endoscopia (*tabela 1*).

Tabela 1 | Causas de elevação da CF na idade pediátrica

Causas	Referência
Infecções:	
Disenteria bacteriana	26–28
Gastroenterite viral	29
Gastrite por <i>helicobacter pylori</i>	30
Fármacos:	
Anti-inflamatórios não-esteróides	28
Alergias alimentares	28,31,32
Outras doenças gastrointestinais:	
Doença de refluxo gastroesofágico	26,30
Fibrose quística	21
Doença celíaca	26,28,32
Doença diverticular	32
Polipose juvenil	21,33,34
Enteropatias autoimunes	35

Henderson *et al*, num estudo posterior, demonstrou ainda uma maior precisão diagnóstica da CF (0.93), com base na área sob a curva, comparativamente aos marcadores sanguíneos: albumina (0.91), VS (0.84), PCR (0.83), plaquetas (0.79), hemoglobina (0.78) e leucócitos (0.70). Este facto

pode ser justificado pela baixa sensibilidade e especificidade dos marcadores sanguíneos no reconhecimento de inflamação a nível da mucosa intestinal³⁶.

Atualmente, a CF é determinada sobretudo através da técnica ELISA, como descrito primeiramente por Roseth *et al* em 1992¹⁶. Desde então, diversos tipos de *kits* ELISA foram desenvolvidos, tendo um estudo recentemente demonstrado a superioridade dos testes monoclonais comparativamente aos testes policlonais³⁷. Nos últimos anos têm sido desenvolvidos testes rápidos que podem ser aplicados com mais facilidade no contexto de cuidados primários. Estes testes podem ser efetuados em menos de 30 minutos e demonstram uma boa correlação com os tradicionais testes ELISA³⁸⁻⁴⁰.

3.2 - Valores de referência

Apesar do grande enfoque que tem sido dado à CF nos últimos anos, existem ainda poucos estudos relativos aos valores de referência adequados à idade pediátrica. A vasta maioria dos estudos realizados apresenta amostras reduzidas e critérios de inclusão diferentes, conduzindo a valores de referência dispares.

Ainda que os valores de CF variem substancialmente com a idade, e independentemente do sexo, é consensual definir 50 µg/g como o *cut-off* ideal para estabelecer o teste como positivo, em crianças com idade >4 anos⁴¹⁻⁴⁴, como sugerido pelo algoritmo da *figura 2*⁴⁵.

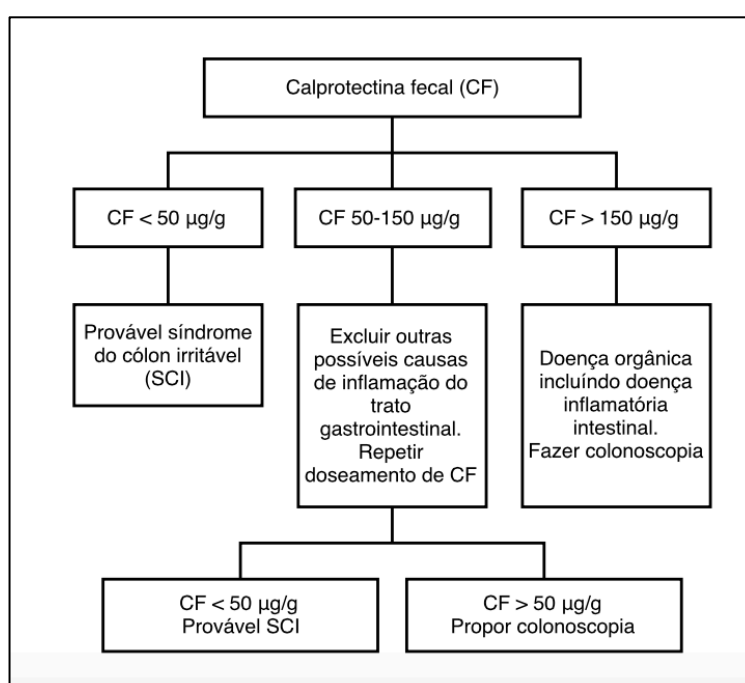


Figura 2 | Algoritmo sugerido para o uso da Calprotectina Fecal no diagnóstico da DII em crianças com idade >4 anos (adaptado de Walsham, N. & Sherwood, R. A. Fecal calprotectin in inflammatory bowel disease.)

No entanto, este valor não é aplicável a crianças com idade <4 anos. No sentido de determinar o *cut-off* ideal para este grupo etário, foram realizados alguns estudos em crianças saudáveis:

- 1) Olafsdottir *et al* verificou níveis mais elevados de CF em latentes, comparativamente a crianças com idade >1 ano (278 µg/g vs. 40 µg/g)⁴⁶.
- 2) Feng Li *et al* demonstrou que os níveis de CF são inversamente proporcionais à idade⁴⁷:
 - a) 1-3 meses: 375.2 µg/g;
 - b) 3-6 meses: 217.9 µg/g;
 - c) 6-18 meses: ~100 µg/g.
- 3) Hestvik *et al* determinou uma relação semelhante⁴²:
 - a) <1 ano: 249 µg/g;
 - b) 1-4 anos: 75 µg/g;
 - c) 4-12 anos: 28 µg/g.

Todos estes estudos indicam que os valores de CF são tanto mais elevados quanto menor a idade da criança, podendo este facto ser justificado pela imaturidade intestinal associada a maior permeabilidade do intestino, com consequente migração transepitelial de neutrófilos para o lúmen intestinal^{48,45}; outro fator fundamental é a inflamação subclínica e fisiológica que poderá estar presente no trato gastrointestinal nos primeiros meses de vida⁵⁰. Contudo, nenhum dos estudos realizados sugeriu um *cut-off* que pudesse ser utilizado na prática clínica em crianças com idade <4 anos. Nesse sentido, mais recentemente, Oord e Hornung propuseram com base no percentil 97.5% da CF, três diferentes limites de *cut-off* de acordo com o grupo etário⁵¹:

1-6 meses	538 µg/g
6 meses – 3 anos	214 µg/g
3-4 anos	75 µg/g

Contudo, estes limites necessitam de maior validação.

A determinação de um *cut-off* bem definido é ainda controversa, sobretudo devido à grande variabilidade intra e interindividual que se verifica em crianças saudáveis⁵². Foram então propostos doseamentos seriados CF, não havendo ainda estudos realizados nesse sentido.

4 - Monitorização da atividade da doença

A DII é uma doença crónica, caracterizada por períodos de remissão intercalados com recidivas, tendo sido determinado por vários autores que o *target* terapêutico ideal passaria não só pela remissão clínica mas também pela reparação completa da mucosa intestinal (ausência de lesões erosivas e úlceras no trato gastrointestinal), com vista à manutenção da remissão, redução do número

de cirurgias, hospitalizações e diminuição da incidência de cancro colo-retal⁵³⁻⁵⁵. A monitorização da atividade inflamatória da doença assume, assim, grande importância.

Atualmente, o *gold standard* para determinação da atividade inflamatória da doença é a endoscopia com biópsia^{7,10}. Em alternativa, são utilizados *clinical activity scores* (PCDAI⁵⁶, PUCAI⁵⁷), calculados através da combinação dos sintomas, sinais físicos e marcadores sanguíneos, os quais têm baixa sensibilidade e podem estar normais na presença de inflamação da mucosa³³. Para determinar estes *scores* as crianças têm de ser puncionadas reiteradamente, existindo o risco de os sintomas serem negligenciados ou subreportados pela própria criança, sobretudo se esta temer ser sujeita a investigações adicionais e outros tratamentos⁵⁸. Os *clinical activity scores* não refletem, portanto, o real grau de inflamação da mucosa intestinal, sendo pouco utilizados na prática clínica. Nos últimos anos tem sido estudada a capacidade da CF na monitorização da atividade inflamatória da DII.

Bunn *et al* demonstrou que a CF correlaciona-se com achados endoscópicos e histológicos, no que diz respeito à avaliação da atividade inflamatória da doença, permitindo identificar crianças que apresentam inflamação ativa, e determinar a extensão e gravidade da mesma com base na concentração de CF. Determinou ainda que a CF correlaciona-se melhor com achados microscópicos ($r = 0.85$) do que com achados macroscópicos ($r = 0.75$), sugerindo a capacidade da CF em detetar inflamação subclínica, não identificável macroscopicamente^{31,59}. Fagerberg *et al*, num estudo posterior, corroborou estes dados, estabelecendo uma correlação entre a CF e achados histológicos superior à da CF e alterações macroscópicas ($r = 0.75$ vs. $r = 0.65$). Verificou ainda concentrações médias de CF $\sim 237 \mu\text{g/g}$ em crianças assintomáticas com achados histológicos positivos, reforçando a capacidade da CF em detetar inflamação subclínica. Nas restantes crianças assintomáticas, mas com histologia negativa, verificou uma concentração média de CF de $9.9 \mu\text{g/g}$, demonstrando que a CF poderá constituir um indicador de reparação completa da mucosa intestinal⁵⁸.

Canani *et al* demonstrou ainda que tendo como referência a análise histológica da mucosa intestinal, a CF ($r = 0.655$) é o segundo marcador mais indicado para determinar a atividade inflamatória intestinal, suplantado somente pela endoscopia ($r = 0.699$). Seguem-se os *clinical activity scores* ($r = 0.288$), VS ($r = 0.156$) e PCR ($r = 0.024$)²⁹. Este estudo sugeriu também que o principal fator que condiciona os níveis de CF é a gravidade da inflamação, ao invés da localização e extensão da mesma, contrariamente ao que indicavam estudos anteriores^{31,58}.

A CF não poderá substituir definitivamente os exames invasivos, que serão sempre necessários para avaliar a extensão da inflamação, parâmetros histológicos e possíveis complicações. No entanto, a CF apresenta-se como um excelente complemento à avaliação e monitorização da atividade inflamatória da doença, especialmente neste contexto em que são necessárias avaliações repetidas.

5 - Monitorização da resposta ao tratamento

A monitorização da resposta ao tratamento na DII baseia-se atualmente na avaliação global dos sintomas, *clinical activity scores*, marcadores inflamatórios séricos e, ocasionalmente, endoscopia. Estudos relativos ao papel da CF neste campo são escassos, sobretudo na idade pediátrica, e só mais recentemente surgiram algumas evidências.

Relativamente a estudos realizados em adultos, Sipponen *et al* avaliou 15 doentes com DC, durante 12 semanas com *infliximab*, efetuando colonoscopia e doseamento da CF antes e após conclusão do tratamento. A colonoscopia demonstrou boa correlação com a CF neste campo ($r = 0.831$), verificando-se uma descida média desta de 1,173 $\mu\text{g/g}$ para 130 $\mu\text{g/g}$ ⁶⁰. Num outro estudo composto por 90 doentes com CU, Ho *et al* concluiu que os doentes que não respondem a terapia médica apresentam valores de CF mais elevados na fase inicial da terapêutica, podendo vir a necessitar de cirurgia⁶¹.

Neste seguimento, num estudo pediátrico constituído por 15 doentes em tratamento com corticóides, Kolho *et al* verificou melhoria clínica em consonância com a diminuição da CF em 7/15 crianças, tendo a descontinuação do tratamento levado à subida da mesma em 5/8⁶². Num outro estudo, constituído por 76 crianças em tratamento com *infliximab*, Kolho *et al* procurou determinar a relação entre a CF medida no período inicial de tratamento e o *outcome* do mesmo a longo prazo. Ao fim da 2ª e/ou 6ª semana de tratamento (fase de indução) verificou-se uma descida significativa dos níveis de CF, alcançando concentrações $<100 \mu\text{g/g}$ em 35% dos doentes. Verificou-se ainda que os doentes que apresentavam níveis mais baixos de CF na fase de indução obtiveram melhor resposta ao tratamento nos meses sucessivos (fase de manutenção), comparativamente aos que não responderam favoravelmente e vieram a necessitar de cirurgia (243 $\mu\text{g/g}$ vs. 483 $\mu\text{g/g}$)⁶³. Contudo, o *outcome* a longo prazo poderá ser sobrestimado quando utilizado o *infliximab*, pois a sua excelente resposta inicial tende a diminuir durante o 1º ano de tratamento num número considerável de crianças. Foi estimado que neste período, 34%-49% dos doentes que respondem à terapêutica na fase inicial necessitam de escalar a dose ou mudar de terapêutica^{64,65}.

Ainda que estes estudos sejam promissores, Turner *et al* demonstrou em doentes com CU em tratamento com corticóides que o *Pediatric Ulcerative Colitis Activity Index* (PUCAI) previu uma resposta ao tratamento e *outcome* com maior precisão que a CF, quando avaliado ao 3º dia de tratamento^{66,67}.

Como tal, é necessário realizar mais estudos nesta área de modo a clarificar a capacidade da CF na gestão do tratamento, assim como em definir *cut-offs* que permitam prever a resposta a longo prazo.

6 - Risco de recidiva

Grande parte dos doentes com melhoria clínica após tratamento apresenta, contudo, algum grau de inflamação residual da mucosa intestinal. A sua persistência poderá levar a lesões gastrointestinais, complicações graves e aumento do risco de recidiva. Como tal, é essencial identificar doentes com maior risco de modo a possibilitar uma intervenção precoce.

Diversos estudos clínicos efetuados em adultos e crianças detetaram níveis elevados de CF, apesar da aparente remissão clínica⁶⁸⁻⁷¹. Num estudo pioneiro realizado em adultos, Tibble *et al* demonstrou que os níveis de CF dos doentes em remissão clínica que recidivaram foram superiores aos que permaneceram em remissão, tendo sido definido um *cut-off* de 250 µg/g a partir do qual o risco de apresentar recidiva durante os 12 meses seguintes é superior, com uma sensibilidade e especificidade de 90% e 83%, respetivamente⁶⁸.

Relativamente a crianças em remissão clínica, um estudo retrospectivo de Diamanti *et al* demonstrou que concentrações de CF >275 µg/g, na fase assintomática da doença, permitem predizer a ocorrência de recidiva num período de 36 meses, com uma sensibilidade e valor preditivo negativo de 97%, e especificidade e valor preditivo positivo de 85%, verificando-se maior correlação na CU do que na DC⁷². Analogamente, Walkiewicz *et al* demonstrou que 90% das crianças com DC em fase quiescente e com valores de CF ≥400 µg/g apresentou recidiva num período de 9 meses. Uma vez que 89% dos doentes deste estudo com níveis <400 µg/g permaneceram em remissão, este *cut-off* permite igualmente identificar doentes com menor risco de recidivar⁷¹.

Sipponen & Kalho demonstraram, contudo, que a CF apresenta um valor preditivo positivo muito baixo (39.6% para >100 µg/g) para a ocorrência de recidiva durante os 12 meses subsequentes. No entanto, o valor preditivo negativo foi substancialmente mais elevado (75% para <100 µg/g), permitindo identificar os doentes com maior probabilidade de permanecer em remissão⁷³.

Pela escassez de estudos nesta área, ainda não é possível definir um *cut-off* consensual que permita predizer a recidiva, contrariamente ao que se verifica nos adultos⁷⁴.

7 – Limitações da CF

1. Doentes podem mostrar-se relutantes em fornecer amostras de fezes, sobretudo se forem necessárias medições seriadas.
2. Apesar da CF apresentar uma distribuição homogénea nas fezes, a sua concentração depende de diversos factores, nomeadamente idade, comorbilidades, dieta e atividade física, podendo apresentar variações consideráveis de dia para dia^{16,75}.

3. A não existência de *cut-offs* bem definidos, tanto para estabelecer o diagnóstico (sobretudo em crianças com idade <4 anos), mas também para determinar a atividade da doença, prever a ocorrência de recidiva e monitorizar a resposta ao tratamento.
4. A CF não é específica de DII, podendo estar igualmente elevada em diversas doenças orgânicas (*tabela 1*).
5. A CF não permite fazer a distinção entre DC e CU⁷⁶.

8 - Discussão

O doseamento da CF em doentes sintomáticos, nomeadamente com dor abdominal e/ou diarreia, demonstrou ser útil sobretudo na exclusão de DII devido à sua elevada sensibilidade e valor preditivo negativo (*tabela 2*). No entanto, a sua inferior especificidade e valor preditivo positivo não permitem confirmar com segurança o diagnóstico²³⁻²⁵. Estes dados terão, contudo, de ser interpretados com ponderação no contexto clínico, uma vez que os estudos pediátricos publicados relativamente ao valor diagnóstico da CF utilizam diferentes limites de *cut-off*, sendo difícil estabelecer comparações entre eles. A maior parte dos estudos utiliza o *cut-off* de 50 µg/g, tal como o recomendando pelas empresas que desenvolvem os testes^{28,30,31,33,34,36,77,78}, enquanto outros utilizam um *cut-off* definido com base no *Receiver Operating Characteristic* (ROC)^{32,79}, ou ainda no percentil 95% de crianças saudáveis²⁷.

Tabela 2 | Valor Preditivo Negativo (VPN) e Valor Preditivo Positivo (VPP) da CF no diagnóstico de DII

Causas	VPP (%)	VPN (%)
Canani ²⁷	91	91
Sidler ³⁰	72	100
Bunn ³¹	100	71
Fagerberg ³³	95	93
Kolho ³⁴	69	100
Henderson ³⁶	61	96
Bonnin ⁷⁷	46	100
Perminow ⁷⁸	83	89
Diamanti ⁷⁹	54	100
Ashorn ⁸⁰	97	67
Média	79%	91%

Apesar dos valores de CF variarem substancialmente com a idade, é aceitável utilizar 50 µg/g como o *cut-off* ideal para definir um teste diagnóstico como positivo em crianças com idade >4 anos⁴¹⁻⁴⁴. No entanto, este valor não é aplicável em crianças com idade <4 anos. Nesta faixa etária, diversos estudos demonstraram que os valores de CF são inversamente proporcionais à idade da criança, não tendo sido, no entanto, estabelecido um *cut-off* que possa ser aplicado na prática

clínica^{42,46,47,51}. Devido à grande variabilidade intra e interindividual que se verifica nesta faixa etária, há a necessidade de se realizarem estudos mais aprofundados relativamente a medições seriadas de CF, como alternativa ao uso de limites definidos⁵².

No diagnóstico da DII, a CF demonstrou ser superior aos *marcadores séricos*, nomeadamente albumina, VS, PCR, plaquetas, hemoglobina e leucócitos³⁶. A abordagem proposta por Van Rheenen *et al* (figura 1), se aplicada, resultaria numa redução de 35% no número de endoscopias realizadas, sendo, no entanto, necessário definir se o número de falsos negativos (5%) e falsos positivos (9%) é aceitável para poder introduzir a CF como primeira ferramenta diagnóstica²³.

Até a data, os estudos referentes ao papel da CF no diagnóstico da DII são quase exclusivamente realizados em centros especializados, sendo escassos a nível dos cuidados primários. De modo a possibilitar uma vigilância continuada, têm sido desenvolvidos testes rápidos que podem ser aplicados com mais facilidade neste contexto³⁸⁻⁴⁰.

Quanto à monitorização da atividade inflamatória da DII, demonstrou-se haver uma relação significativa entre os níveis de CF e a atividade da doença (determinada por endoscopia e por biópsia), permitindo deste modo estabelecer a extensão e gravidade do processo inflamatório com base nas concentrações de CF. A sua forte correlação com achados histológicos permite ainda detetar inflamação a nível subclínico, não reconhecível macroscopicamente, demonstrando também ser superior aos *clinical activity scores* e marcadores séricos na determinação da atividade inflamatória ao nível da mucosa intestinal^{29,31,58}. A CF permite então uma monitorização não invasiva, sendo especialmente vantajosa quando são necessárias avaliações repetidas, não podendo, contudo, substituir definitivamente a endoscopia.

A monitorização da resposta ao tratamento na DII baseia-se atualmente na avaliação global dos sintomas, *clinical activity scores*, marcadores séricos inflamatórios e ocasionalmente endoscopia. No entanto, já existe evidência de correlação entre a melhoria clínica e diminuição da CF, demonstrando-se que a determinação da concentração da mesma na fase inicial do tratamento poderá prever sobre a resposta à terapêutica a longo prazo^{62,63}. Assim, a CF poderá ser útil na determinação precoce da probabilidade de resposta à terapêutica, tendo sido proposto o doseamento da CF antes de uma possível alteração ao tratamento⁶². No entanto, outros estudos apontam que os *clinical activity scores* preveem a resposta ao tratamento e *outcome* com maior precisão que a CF^{66,67}. Deste modo, a CF poderá ser de extrema utilidade na monitorização da resposta ao tratamento, requerendo, contudo, estudos mais aprofundados.

Demonstrou-se ainda que valores elevados de CF em doentes em remissão clínica predis põem à ocorrência recidiva nos meses subsequentes, sendo assim possível reconhecer doentes com risco aumentado e intervir adequadamente^{71,72}. No entanto, alguns estudos indicam que o valor preditivo

negativo da CF em prever a recidiva é superior ao valor positivo, justificando-se a necessidade de estudos mais aprofundados que clarifiquem a utilidade da CF nesta área⁷³.

9 – Conclusão

O doseamento da CF é um método simples, económico e não-invasivo, que pode ser extremamente útil para estabelecer o diagnóstico de DII em crianças com sintomatologia gastrointestinal sugestiva. Este método permite igualmente monitorizar a atividade inflamatória da doença, e presumivelmente, prever a ocorrência de recidiva e resposta ao tratamento. Apesar da endoscopia não ser definitivamente substituível, a introdução da CF como marcador complementar poderá melhorar a qualidade de vida do doente, reduzindo o número de endoscopias realizadas, complicações e custos associados. No entanto, e apesar dos resultados serem promissores, é ainda necessário realizar mais estudos na idade pediátrica, de modo a obter maior validação deste método e definir *cut-offs* mais precisos.

Bibliografia

1. National Institute for Health and Clinical Excellence. Faecal calprotectin diagnostic test for inflammatory diseases of the bowel. NICE diagnostic guideline 11. London UK. 2013.
2. Gismera, C. S. & Aladren, B. S. Inflammatory bowel diseases: a disease (s) of modern times? Is incidence still increasing? *World J Gastroenterol* **14**, 5491–5498 (2008).
3. Auvin, S. *et al.* Incidence, clinical presentation and location at diagnosis of pediatric inflammatory bowel disease: a prospective population-based study in northern France (1988-1999). *J Pediatr Gastroenterol Nutr* **41**, 49–55 (2005).
4. Kelsen, J. & Baldassano, R. N. Inflammatory bowel disease: the difference between children and adults. *Inflamm Bowel Dis* **14 Suppl 2**, S9–11 (2008).
5. Kugathasan, S. & Amre, D. Inflammatory bowel disease--environmental modification and genetic determinants. *Pediatr Clin North Am* **53**, 727–749 (2006).
6. Bouma, G. & Strober, W. The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease. *Nat Rev Immunol* **3**, 521–533 (2003).
7. Stange, E. F. *et al.* European evidence based consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease: definitions and diagnosis. *Gut* **55 Suppl 1**, i1–15 (2006).
8. Bruining, D. H. *et al.* Prevalence of penetrating disease and extraintestinal manifestations of Crohn's disease detected with CT enterography. *Inflamm. Bowel Dis.* **14**, 1701–1706 (2008).
9. Vavricka, S. R. *et al.* Frequency and risk factors for extraintestinal manifestations in the Swiss inflammatory bowel disease cohort. *Am J Gastroenterol* **106**, 110–119 (2011).
10. Van Assche, G. *et al.* The second European evidence-based Consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease: Special situations. *J Crohns Colitis* **4**, 63–101 (2010).
11. Ruemmele, F. M. *et al.* Consensus guidelines of ECCO/ESPGHAN on the medical management of pediatric Crohn's disease. *J. Crohns. Colitis* 1179–1207 (2014). doi:10.1016/j.crohns.2014.04.005
12. Turner, D. *et al.* Management of pediatric ulcerative colitis: joint ECCO and ESPGHAN evidence-based consensus guidelines. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* **55**, 340–361 (2012).
13. Gaya, D. R. *et al.* Faecal calprotectin in the assessment of Crohn's disease activity. *QJM* **98**, 435–441 (2005).
14. Johne, B. *et al.* Functional and clinical aspects of the myelomonocyte protein calprotectin. *Mol Pathol* **50**, 113–123 (1997).
15. Roseth, A. G., Aadland, E., Jahnsen, J. & Raknerud, N. Assessment of disease activity in ulcerative colitis by faecal calprotectin, a novel granulocyte marker protein. *Digestion* **58**, 176–180 (1997).

16. Roseth, A. G., Fagerhol, M. K., Aadland, E. & Schjonsby, H. Assessment of the neutrophil dominating protein calprotectin in feces. A methodologic study. *Scand J Gastroenterol* **27**, 793–798 (1992).
17. Sawczenko, A. & Sandhu, B. K. Presenting features of inflammatory bowel disease in Great Britain and Ireland. *Arch Dis Child* **88**, 995–1000 (2003).
18. Kim, S. C. & Ferry, G. D. Inflammatory bowel diseases in pediatric and adolescent patients: clinical, therapeutic, and psychosocial considerations. *Gastroenterology* **126**, 1550–1560 (2004).
19. Levine, A. *et al.* ESPGHAN revised porto criteria for the diagnosis of inflammatory bowel disease in children and adolescents. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* **58**, 795–806 (2014).
20. Kawada, P. S. *et al.* Are We Overdoing Pediatric Lower Gastrointestinal Endoscopy? *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* (2016). doi:10.1097/MPG.0000000000001192
21. Joishy, M. *et al.* Fecal calprotectin and lactoferrin as noninvasive markers of pediatric inflammatory bowel disease. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **48**, 48–54 (2009).
22. von Roon, A. C. *et al.* Diagnostic precision of fecal calprotectin for inflammatory bowel disease and colorectal malignancy. *Am. J. Gastroenterol.* **102**, 803–13 (2007).
23. van Rheenen, P. F., Van de Vijver, E. & Fidler, V. Faecal calprotectin for screening of patients with suspected inflammatory bowel disease: diagnostic meta-analysis. *BMJ* **341**, c3369 (2010).
24. Henderson, P., Anderson, N. H. & Wilson, D. C. The diagnostic accuracy of fecal calprotectin during the investigation of suspected pediatric inflammatory bowel disease: a systematic review and meta-analysis. *Am. J. Gastroenterol.* **109**, 637–45 (2014).
25. Degraeuwe, P. L. J. *et al.* Faecal Calprotectin in Suspected Paediatric Inflammatory Bowel Disease. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **60**, 339–346 (2015).
26. Berni Canani, R. *et al.* Diagnostic value of faecal calprotectin in paediatric gastroenterology clinical practice. *Dig. Liver Dis.* **36**, 467–70 (2004).
27. Canani, R. B. *et al.* Combined use of noninvasive tests is useful in the initial diagnostic approach to a child with suspected inflammatory bowel disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* **42**, 9–15 (2006).
28. Bremner, A., Roked, S., Robinson, R., Phillips, I. & Beattie, M. Faecal calprotectin in children with chronic gastrointestinal symptoms. *Acta Paediatr.* **94**, 1855–8 (2005).
29. Canani, R. B. *et al.* Faecal calprotectin as reliable non-invasive marker to assess the severity of mucosal inflammation in children with inflammatory bowel disease. *Dig. Liver Dis.* **40**, 547–53 (2008).
30. Sidler, M. a., Leach, S. T. & Day, A. S. Fecal S100A12 and fecal calprotectin as noninvasive markers for inflammatory bowel disease in children. *Inflamm. Bowel Dis.* **14**, 359–366 (2008).
31. Bunn, S. K. *et al.* Fecal calprotectin: validation as a noninvasive measure of bowel inflammation in childhood inflammatory bowel disease. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **33**, 14–22 (2001).
32. Carroccio, A. *et al.* Diagnostic accuracy of fecal calprotectin assay in distinguishing organic causes of chronic diarrhea from irritable bowel syndrome: A prospective study in adults and children. *Clin. Chem.* **49**, 861–867 (2003).

33. Fagerberg, U. L., Löf, L., Myrdal, U., Hansson, L.-O. & Finkel, Y. Colorectal inflammation is well predicted by fecal calprotectin in children with gastrointestinal symptoms. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **40**, 450–455 (2005).
34. Kolho, K.-L., Raivio, T., Lindahl, H. & Savilahti, E. Fecal calprotectin remains high during glucocorticoid therapy in children with inflammatory bowel disease. *Scand. J. Gastroenterol.* **41**, 720–5 (2006).
35. Kapel, N. *et al.* Fecal tumor necrosis factor-alpha and calprotectin as differential diagnostic markers for severe diarrhea of small infants. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **41**, 396–400 (2005).
36. Henderson, P. *et al.* The diagnostic accuracy of fecal calprotectin during the investigation of suspected pediatric inflammatory bowel disease. *Am. J. Gastroenterol.* **107**, 941–9 (2012).
37. Burri, E. & Beglinger, C. Faecal calprotectin - A useful tool in the management of inflammatory bowel disease. *Swiss Med. Wkly.* **142**, 1–12 (2012).
38. Wassell, J., Wallage, M. & Brewer, E. Evaluation of the Quantum Blue(R) rapid test for faecal calprotectin. *Ann. Clin. Biochem.* **49**, 55–58 (2012).
39. Sydora, M. J., Sydora, B. C. & Fedorak, R. N. Validation of a point-of-care desk top device to quantitate fecal calprotectin and distinguish inflammatory bowel disease from irritable bowel syndrome. *J. Crohn's Colitis* **6**, 207–214 (2012).
40. Kolho, K. L. *et al.* Rapid test for fecal calprotectin levels in children with Crohn disease. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **55**, 436–9 (2012).
41. Fagerberg, U. L., Löf, L., Merzoug, R. D., Hansson, L.-O. & Finkel, Y. Fecal calprotectin levels in healthy children studied with an improved assay. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **37**, 468–472 (2003).
42. Hestvik, E. *et al.* Faecal calprotectin concentrations in apparently healthy children aged 0-12 years in urban Kampala, Uganda: A community-based survey. *BMC Pediatr.* **11**, E150 (2011).
43. Tøn, H. *et al.* Improved assay for fecal calprotectin. *Clin. Chim. Acta* **292**, 41–54 (2000).
44. Campeotto, F. *et al.* Fecal calprotectin: cutoff values for identifying intestinal distress in preterm infants. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **48**, 507–510 (2009).
45. Walsham, N. E. & Sherwood, R. A. Fecal calprotectin in inflammatory bowel disease. *Clinical and Experimental Gastroenterology* **9**, 21–29 (2016).
46. Olafsdottir, E., Aksnes, L., Fluge, G. & Berstad, A. Faecal calprotectin levels in infants with infantile colic, healthy infants, children with inflammatory bowel disease, children with recurrent abdominal pain and healthy children. *Acta Paediatr* **91**, 45–50 (2002).
47. Li, F. *et al.* Fecal calprotectin concentrations in healthy children aged 1-18 months. *PLoS One* **10**, e0119574 (2015).
48. Campeotto, F. *et al.* High faecal calprotectin concentrations in newborn infants. *Arch. Dis. Child. Fetal Neonatal Ed.* **89**, F353–5 (2004).
49. Nissen, A. C. *et al.* Fecal calprotectin in healthy term and preterm infants. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition* **38**, 107–108 (2004).

50. Roseth, A. G., Schmidt, P. N. & Fagerhol, M. K. Correlation between faecal excretion of indium-111-labelled granulocytes and calprotectin, a granulocyte marker protein, in patients with inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol* **34**, 50–54 (1999).
51. Oord, T. & Hornung, N. Fecal calprotectin in healthy children. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* **74**, 254–258 (2014).
52. Vaos, G., Kostakis, I. D., Zavras, N. & Chatzemichael, A. The role of calprotectin in pediatric disease. *Biomed Res. Int.* **2013**, 542363 (2013).
53. Peyrin-Biroulet, L. *et al.* Results from the 2nd Scientific Workshop of the ECCO (I): Impact of mucosal healing on the course of inflammatory bowel disease. *J. Crohn's Colitis* **5**, 477–483 (2011).
54. Arnott, I. D. R., Watts, D. & Ghosh, S. Review article: is clinical remission the optimum therapeutic goal in the treatment of Crohn's disease? *Aliment. Pharmacol. Ther.* **16**, 857–867 (2002).
55. Berni Canani, R. *et al.* Short- and long-term therapeutic efficacy of nutritional therapy and corticosteroids in paediatric Crohn's disease. *Dig. Liver Dis.* **38**, 381–387 (2006).
56. Hyams, J. S. *et al.* Development and validation of a pediatric Crohn's disease activity index. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition* **12**, (1991).
57. Turner, D. *et al.* Development, validation, and evaluation of a pediatric ulcerative colitis activity index: a prospective multicenter study. *Gastroenterology* **133**, 423–432 (2007).
58. Fagerberg, U. L., Löf, L., Lindholm, J., Hansson, L.-O. & Finkel, Y. Fecal calprotectin: a quantitative marker of colonic inflammation in children with inflammatory bowel disease. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **45**, 414–420 (2007).
59. Sanderson, I. R., Boyle, S., Williams, C. B. & Walker-Smith, J. A. Histological abnormalities in biopsies from macroscopically normal colonoscopies. *Arch. Dis. Child.* **61**, 274–277 (1986).
60. Sipponen, T. *et al.* Fecal calprotectin, lactoferrin, and endoscopic disease activity in monitoring anti-TNF-alpha therapy for Crohn's disease. *Inflamm. Bowel Dis.* **14**, 1392–1398 (2008).
61. Ho, G. T. *et al.* Fecal calprotectin predicts the clinical course of acute severe ulcerative colitis. *Am. J. Gastroenterol.* **104**, 673–678 (2009).
62. Kolho KL1, Raivio T, Lindahl H, S. E. Fecal calprotectin remains high during glucocorticoid therapy in children with inflammatory bowel disease. *Scand. J. Gastroenterol.* **41**, 720–725 (2006).
63. Kolho, K.-L. & Sipponen, T. The long-term outcome of anti-tumor necrosis factor- α therapy related to fecal calprotectin values during induction therapy in pediatric inflammatory bowel disease. *Scand. J. Gastroenterol.* **49**, 434–441 (2014).
64. Hyams, J. *et al.* Induction and maintenance infliximab therapy for the treatment of moderate-to-severe Crohn's disease in children. *Gastroenterology* **132**, 863–866 (2007).
65. Hyams, J. S. *et al.* Long-term outcome of maintenance infliximab therapy in children with Crohn's disease. *Inflamm. Bowel Dis.* **15**, 816–822 (2009).

66. Turner, D. *et al.* Faecal calprotectin, lactoferrin, M2-pyruvate kinase and S100A12 in severe ulcerative colitis: a prospective multicentre comparison of predicting outcomes and monitoring response. *Gut* **59**, 1207–12 (2010).
67. Turner, D. *et al.* Severe pediatric ulcerative colitis: a prospective multicenter study of outcomes and predictors of response. *Gastroenterology* **138**, 2282–91 (2010).
68. Tibble, J. a, Sigthorsson, G., Bridger, S., Fagerhol, M. K. & Bjarnason, I. Surrogate markers of intestinal inflammation are predictive of relapse in patients with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* **119**, 15–22 (2000).
69. Costa, F. *et al.* Role of faecal calprotectin as non-invasive marker of intestinal inflammation. *Dig. Liver Dis.* **35**, 642–647 (2003).
70. Thjodleifsson, B. *et al.* Subclinical intestinal inflammation: An inherited abnormality in Crohn's disease relatives? *Gastroenterology* **124**, 1728–1737 (2003).
71. Walkiewicz, D. *et al.* Fecal calprotectin is useful in predicting disease relapse in pediatric inflammatory bowel disease. *Inflamm. Bowel Dis.* **14**, 669–673 (2008).
72. Diamanti, A. *et al.* Clinical role of calprotectin assay in determining histological relapses in children affected by inflammatory bowel diseases. *Inflamm. Bowel Dis.* **14**, 1229–1235 (2008).
73. Sipponen, T. & Kolho, K.-L. Faecal calprotectin in children with clinically quiescent inflammatory bowel disease. *Scand. J. Gastroenterol.* **45**, 872–877 (2010).
74. Gisbert, J. P. *et al.* Fecal calprotectin and lactoferrin for the prediction of inflammatory bowel disease relapse. *Inflamm. Bowel Dis.* **15**, 1190–8 (2009).
75. Poullis, A., Foster, R., Mendall, M. A. & Fagerhol, M. K. Emerging role of calprotectin in gastroenterology. *J Gastroenterol Hepatol* **18**, 756–762 (2003).
76. Tibble, J. A., Sigthorsson, G., Foster, R., Forgacs, I. & Bjarnason, I. Use of surrogate markers of inflammation and Rome criteria to distinguish organic from nonorganic intestinal disease. *Gastroenterology* **123**, 450–460 (2002).
77. Bonnin Tomas, A., Vila Vidal, M. & Rosell Camps, A. [Fecal calprotectin as a biomarker to distinguish between organic and functional gastrointestinal disease]. *Rev Esp Enferm Dig* **99**, 689–693 (2007).
78. Perminow, G. *et al.* A characterization in childhood inflammatory bowel disease, a new population-based inception cohort from South-Eastern Norway, 2005-07, showing increased incidence in Crohn's disease. *Scand. J. Gastroenterol.* **44**, 446–56 (2009).
79. Diamanti, A. *et al.* Diagnostic work-up of inflammatory bowel disease in children: The role of calprotectin assay. *Nutr. Clin. Pract.* **25**, 416–417 (2010).
80. Ashorn, S. *et al.* Fecal calprotectin levels and serological responses to microbial antigens among children and adolescents with inflammatory bowel disease. *Inflamm. Bowel Dis.* **15**, 199–205 (2009).